

OIL AND FAT FOR DIMINISHING LIPID IN BLOOD

Publication number: JP9013075

Publication date: 1997-01-14

Inventor: TSUJI HIROAKI; SETO AKIRA; IMAIZUMI KATSUMI;
IKEDA IKUO

Applicant: NISSHIN OIL MILLS LTD

Classification:

- international: A61K31/23; A61K35/12; A61P3/06; C11B1/10;
C11B7/00; C11C3/00; C11C3/10; A23D9/007;
A61K31/21; A61K35/12; A61P3/00; C11B1/00;
C11B7/00; C11C3/00; A23D9/007; (IPC1-7):
A23D9/007; A61K31/23; A61K35/12; A61K35/80;
C11C3/00; C11B1/10; C11B7/00; C11C3/10

- european:

Application number: JP19950191082 19950704

Priority number(s): JP19950191082 19950704

Report a data error here

Abstract of JP9013075

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain an oil and fat having a reducing effect on the concentration of lipids in blood by using triglycerides in which the fatty acid moieties comprise ones derived from at least one specific unsaturated fatty acid and the amount of the 2-position acid moieties derived from the specific acid is not larger than a specific value. **SOLUTION:** This oil and fat having a reducing effect on the concentration of lipids in blood comprises preferably at least 5wt. % triglycerides in which the fatty acid moieties comprise ones derived from at least one long-chain polybasic unsaturated fatty acid of the n-3 type (a) and the amount of the 2-position acid moieties derived from the acid (a) is less than 40mol% of all units derived from the acid (a). The acid (a) is preferably at least one selected from the group consisting of α -linolenic acid, arachidonic acid, eicosapentaenoic acid, docosapentaenoic acid, and decosaheptaenoic acid.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平9-13075

(43)公開日 平成9年(1997)1月14日

(51)Int.Cl. ⁸	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 1 C	3/00		C 1 1 C	3/00
C 1 1 B	1/10		C 1 1 B	1/10
	7/00			7/00
C 1 1 C	3/10		C 1 1 C	3/10
// A 2 3 D	9/007		A 6 1 K	31/23
			ADN	
審査請求 未請求 請求項の数8 F D (全 14 頁) 最終頁に続く				

(21)出願番号 特願平7-191082

(22)出願日 平成7年(1995)7月4日

(71)出願人 000227009

日清製油株式会社

東京都中央区新川1丁目23番1号

(72)発明者 辻 宏明

東京都世田谷区八幡山3-14-9

(72)発明者 瀬戸 明

神奈川県横浜市戸塚区上倉田町2007-27-201

(72)発明者 今泉 勝己

福岡県福岡市西区福重4-16-16

(72)発明者 池田 郁男

福岡県宗像市自由が丘南2-15-3

(54)【発明の名称】 血中脂質を低減する油脂

(57)【要約】

【構成】 グリセリドの構成脂肪酸としてn-3系長鎖多価不飽和脂肪酸を含み、n-3系長鎖多価不飽和脂肪酸の総量の40モル%未満がグリセリドの2位に結合したトリグリセリドからなる油脂および該トリグリセリドを含有してなる油脂。

【効果】 本発明の油脂は、従来のn-3系長鎖多価不飽和脂肪酸供給源より少量の摂取で、血中トリグリセリド値および／またはコレステロール値を減少させ、血中脂質改善を容易ならしめる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 グリセリドの構成脂肪酸としてn-3系長鎖多価不飽和脂肪酸を含み、n-3系長鎖多価不飽和脂肪酸の総量の40モル%未満がグリセリドの2位に結合したトリグリセリドからなることを特徴とする血中脂質濃度を低減する作用のある油脂。

【請求項2】 請求項1に記載のトリグリセリドを5重量%以上含有してなることを特徴とする血中脂質濃度を低減する作用のある油脂。

【請求項3】 n-3系長鎖多価不飽和脂肪酸が α -リノレン酸、アラキドン酸、エイコサペンタエン酸、ドコサペンタエン酸およびドコサヘキサエン酸からなる群から選ばれる1種もしくは2種以上である請求項1または2に記載の油脂。

【請求項4】 n-3系長鎖多価不飽和脂肪酸がエイコサペンタエン酸および/またはドコサヘキサエン酸である請求項1または2に記載の油脂。

【請求項5】 トリグリセリドが海産哺乳動物もしくは微細藻類から得られるものまたはこれらを濃縮処理したものまたはこれらをエステル交換処理したものである請求項1~4のいずれか1項に記載の油脂。

【請求項6】 海産哺乳動物がクジラまたはアザラシである請求項5に記載の油脂。

【請求項7】 微細藻類がナンノクロロプシス属、トラストキトリウム属、イソクリシス属またはクリプテコディニウム属のいずれかに属するものである請求項5に記載の油脂。

【請求項8】 トリグリセリドがグリセリドの1, 3位に特異性を有するリパーゼを用い、エステル交換反応によって製造されたものである請求項1, 2または5のいずれか1項に記載の油脂。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は血中脂質濃度を低減する作用のある油脂に関する。

【0002】

【従来の技術】血中の脂質濃度を評価する項目としてはコレステロール、トリグリセリド、リン脂質および遊離脂肪酸が知られており、これらの脂質含量が増加した状態が高脂血症である。血清コレステロール値と虚血性心疾患の発症危険率との間には正の相関が認められ、しかも血清コレステロール値を低下させると虚血性心疾患の発症危険率も低下することが疫学調査より明らかにされている（例えば、水島裕ら、「今日の治療薬（1993年版）」、第361頁、南江堂）。また高トリグリセリド血症は脂肪肝、膵炎等の発症に結びつくほか、虚血性心疾患の危険因子としての側面も指摘されている。そのため臨床的には、高脂血症のなかでも特に高コレステロール血症および高トリグリセリド血症が大きな問題となっている。

【0003】高脂血症が発症した場合、一般的には高脂血症患者に対して摂取カロリー制限等の食事療法を2~3カ月間行い、血清中の脂質量の推移を観察した後、主に冠状動脈疾患をはじめとする動脈硬化性疾患につながる危険因子を排除するためにクロフィブラート、ニコチン酸コレステラミン等の抗高脂血症剤が投与され、血清中のコレステロール値やトリグリセリド値を低減化させることが行われている。

【0004】一方、エイコサペンタエン酸(all cis-5,8,11,14,17-eicosapentaenoic acid、以下EPAと略す。C_{20:5}、Cの後の数字は総炭素数：二重結合数を表わし以下同様とする。)やドコサヘキサエン酸(all cis-4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic acid、以下DHAと略す。C_{22:6})のようなn-3系長鎖多価不飽和脂肪酸およびこれらを含む食品素材が血清中トリグリセリド値やコレステロール値を低減させる作用があることが動物実験や臨床実験により明らかにされてきた（例えば、Robinson, D.R.ら、J.Lipid Res.、第34巻、第1435頁、1993年）。血清中トリグリセリド値の低減化の作用機序はn-3系長鎖多価不飽和脂肪酸を含む油脂の摂取により肝臓内でのトリグリセリド合成能が抑制され、その結果として血中へのトリグリセリドの放出が抑制されるためと推測されている（原 健次、油脂、第46巻、No. 4、第90頁、1993年）。また、血清中コレステロール値の低減はn-3系長鎖多価不飽和脂肪酸が肝臓におけるコレステロール合成能を抑制することによるものと推定されている。（Choi, Y.S.ら、Lipids、第24巻、第45頁、1989年）。

【0005】そこで、高脂血症の予防や高脂血症患者の血清脂質濃度を改善する目的で、EPAやDHAを含む魚を多く含む食品を意図的に摂取したり、EPAやDHAを含む魚油や魚油濃縮物等を素材とする健康食品等が市販されている。しかしこれらは多量かつ長期間にわたり摂取あるいは投与することが必要であった。EPAやDHAを含む魚油としては主にイワシ油、タラ肝油、ニシン油、イカ油、マグロ眼窩油等が用いられるが、これらの油脂の化学的構造はいずれもグリセリドにエステル結合して存在するn-3系長鎖多価不飽和脂肪酸の総量の50モル%以上が、トリグリセリドの2位の構成脂肪酸としてあり、換言すれば、n-3系長鎖多価不飽和脂肪酸は1位および3位よりも2位により多くエステル結合したトリグリセリド構造をとっている。

【0006】一方、EPAやDHAは前記のように血清脂質の低減化効果を有する反面、通常の例えば食用植物油を構成する脂肪酸に比べて二重結合を分子内に数多く持つため酸化され易く、過剰に摂取すると生体に有害な作用をもたらすことも知られている。生体内で脂質の過酸化反応が進行すると生体膜に障害を生じ、虚血性疾患、動脈硬化、白内障、癌、アルツハイマー病、膠原病 アミロイドーシス等の病変の原因となることが推測

されている。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、このような現状に鑑みなされたものであり、その目的とするところは、ヒトをはじめ動物に対して、副作用がなく、従来のn-3系長鎖多価不飽和脂肪酸供給源よりも少量の摂取で、血中脂質濃度を減少させ、血中脂質改善を容易ならしめる作用のある油脂を提供することにある。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記目的を達成すべく鋭意研究を行った結果、グリセリド構造の1位および/または3位にn-3系長鎖多価不飽和脂肪酸を多く含む油脂は、n-3系長鎖多価不飽和脂肪酸の供給源として用いられている、2位にn-3系長鎖多価不飽和脂肪酸を多く含む魚油に比べて血清コレステロール値やトリグリセリド値を減少させる効果が顕著に高く、上記の目的が達成されることを見出した。本発明はかかる知見に基づいて完成されたものである。

【0009】すなわち本発明の要旨は、グリセリドの構成脂肪酸としてn-3系長鎖多価不飽和脂肪酸を含み、n-3系長鎖多価不飽和脂肪酸の総量の40モル%未満がグリセリドの2位に結合したトリグリセリドからなる、または該トリグリセリドを含有してなることを特徴とする血中脂質濃度を低減する作用のある油脂である。

【0010】本発明で特徴とするトリグリセリドは、n-3系長鎖多価不飽和脂肪酸を含有する脂肪酸とグリセリンとから構成されるトリグリセリドにおいて、n-3系長鎖多価不飽和脂肪酸の総量を100モル%としたとき、その40モル%未満とn-3系長鎖多価不飽和脂肪酸以外の任意の脂肪酸とがトリグリセリドの2位にエステル結合しており、かつn-3系長鎖多価不飽和脂肪酸の60モル%以上とn-3系長鎖多価不飽和脂肪酸以外の任意の脂肪酸とがトリグリセリドの1位および3位においてランダムにまたは非ランダムに分布してエステル結合しているものである。

【0011】ここにn-3系長鎖多価不飽和脂肪酸とは炭素数が18以上で二重結合を3個以上を有するn-3系直鎖状不飽和脂肪酸をいい、具体的には α -リノレン酸(C_{18:3})、オクタデカテトラエン酸(C_{18:4}、6,9,12,15-octadecatetraenoic acid)、アラキドン酸(C_{20:4})、EPA(C_{20:5})、ドコサペンタエン酸(C_{22:5}、7,10,13,16,19-docosapentaenoic acid)、DHA(C_{22:6})等を例示することができる。本発明では、これらのうち α -リノレン酸、アラキドン酸、EPA、ドコサペンタエン酸およびDHAからなる群から選ばれる1種もしくは2種以上の任意の割合の混合脂肪酸が好ましく、さらにはEPAおよび/またはDHAがより好ましい。

【0012】またn-3系長鎖多価不飽和脂肪酸以外の脂肪酸としては、短鎖中鎖および長鎖各脂肪酸また

飽和および不飽和各脂肪酸のいかなるものも使用できるが、このうち直鎖状であって、炭素数が6以上の中鎖ないし長鎖の、飽和または不飽和脂肪酸に属するものが望ましい。かかる脂肪酸としてカプロン酸(C_{6:0})、カプリル酸(C_{8:0})、カプリン酸(C_{10:0})、ラウリン酸(C_{12:0})、ミリスチン酸(C_{14:0})、パルミチン酸(C_{16:0})、パルミトオレイン酸(C_{16:1})、ステアリン酸(C_{18:0})、オレイン酸(C_{18:1})、エライジン酸(C_{18:1})、リノール酸(C_{18:2})、 α' -リノレン酸(C_{18:3}、5,8,11-オクタデカトリエン酸)、 γ -リノレン酸(C_{18:3}、6,9,12-オクタデカトリエン酸)、エレオステアリン酸(C_{18:3}、9,11,13-オクタデカトリエン酸)、アラキジン酸(C_{20:0})、ガドレイン酸(C_{20:1})、ベヘン酸(C_{22:0})、エルカ酸(C_{22:1})、ブラシジン酸(C_{22:1})等をあげることができる。これらの脂肪酸は単独で用いてよく、または任意の割合の混合脂肪酸として使用してもさしつかえない。なお、これらのうち、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸等が好ましい。

【0013】前記したn-3系長鎖多価不飽和脂肪酸およびこれ以外の脂肪酸で構成される本発明のトリグリセリドを製造するには、化学合成法、エステル交換法、あるいは天然物からの抽出法等の技術を利用すればよい。化学合成法としては、例えば所望量および組成の脂肪酸、脂肪酸無水物あるいは脂肪酸ハロゲン化物(脂肪酸クロライド)とグリセリンとを、酸性物質(塩酸、硫酸、パラトルエンスルホン酸等)、アルカリ性物質(水酸化ナトリウム、水酸化カリウム等)、金属(亜鉛、スズ、チタン、ニッケル等)、金属酸化物(酸化亜鉛、アルミナ、酸化第一鉄等)、金属ハロゲン化物(塩化アルミニウム、塩化スズ等)等のエステル化触媒の存在下または非存在下で、窒素ガス気流中にて100~250℃に加熱し、生成する水を除去しながら1~25時間エステル化反応せしめるのがよい。

【0014】エステル化生成物は必要に応じてアルカリ脱酸処理、活性炭、活性白土、アルミナ、シリカゲル、イオン交換樹脂等を用いる吸着・分画処理、メタノールやエタノール等の親水性有機溶剤および/またはn-ヘキサンやキシレン等の親油性有機溶剤を用いる溶剤分別処理を施して遊離脂肪酸、モノグリセリド、ジグリセリド、着色物質、有臭成分等の不純物を除去し、さらにはこれらの処理を適宜に組み合わせ、トリグリセリドの2位に結合するn-3系長鎖多価不飽和脂肪酸残基の含有量が、トリグリセリドの1位、2位および3位に結合するn-3系長鎖多価不飽和脂肪酸残基の総含有量の40モル%未満となるようにトリグリセリド成分を分画ないしは濃縮してもよい。なお本発明のトリグリセリドは、例えば加熱かつ減圧下に水蒸気を吹き込み脱臭処理しておくことが望ましい。

【0015】エステル交換法を利用した本発明のトリグ

リセリドを得るには、例えば原料として $n-3$ 系長鎖多価不飽和脂肪酸を多量に含有する脂肪酸のトリグリセリド（成分 $a-1$ ）と $n-3$ 系長鎖多価不飽和脂肪酸を実質的に含まないか少量含有の脂肪酸（成分 $a-2$ ）、成分 $a-2$ の低級アルコールエステル（メチルエステル、エチルエステル等。以下同様。）または成分 $a-2$ のトリグリセリドとを所望割合で混合し、あるいは $n-3$ 系長鎖多価不飽和脂肪酸を実質的に含まないか少量含有の脂肪酸のトリグリセリド（成分 $b-1$ ）と $n-3$ 系長鎖多価不飽和脂肪酸を多量に含有する脂肪酸（成分 $b-2$ ）または成分 $b-2$ の低級アルコールエステルとを所要量混合し、触媒として水酸化ナトリウム、水酸化カリウム等のアルカリ性物質、ナトリウムメチラート、ナトリウムエチラート、リチウムブチラート等の金属アルコラート（金属アルコキシド）、塩基性アニオン交換樹脂、酸性カチオン交換樹脂等のイオン交換樹脂、あるいはリパーゼを用いてエステル交換反応を行わしめるのが簡便である。なお触媒として特定のリパーゼを用いてエステル交換すると、後述するように、トリグリセリドの1位および3位に選択的に新たな脂肪酸基を導入することができ、本発明のトリグリセリドを製造する方法として望ましい。

【0016】前記エステル交換の原料は、成分 $a-1$ としてアマニ油、エゴマ油、シソ油等の植物油、イワシ油、タラ肝油、ニシン油、イカ油、マグロ眼窩油等の魚油、クジラ、アザラシ、オットセイ等の海産哺乳動物を起源として得られる圧搾もしくは抽出油、該動物の乳脂、クロレラ、スピルリナ、ドナリエラ等またナンノクロロプシス属（例えば *Nannochloropsis oculata*）、トラストキトリウム属（例えば *Thraustochytrium aureum*）、クリプテコディニウム属（例えば *Cryptocodinium cohnii*）、イソクリシス属（例えば *Isochrysis galbana*）等に属する微細藻類から抽出された油脂、モルティエラ（*Mortierella*）属等の微生物に由来する油脂、また $n-3$ 系長鎖多価不飽和脂肪酸またはこれを任意の割合で含む前記各種脂肪酸（段落番号0012の項参照）との混合脂肪酸のトリグリセリドを使用できる。成分 $a-2$ としては段落番号0012の項に記載の各種脂肪酸またはその誘導体を用いることができる。

【0017】また成分 $b-1$ として動植物、微生物、微細藻類等から得られるトリグリセリドがあり、大豆油、菜種油、綿実油、コーン油、パーム油、ヤシ油、サフラワー油、ハイオレイックサフラワー油、ヒマワリ油、ハイオレイックヒマワリ油、オリーブ油、落花生油、カカオ脂、チャイニーズ タロウ、サル脂、シア脂、牛脂、ラード、これらの水素添加油脂、分別油脂、前記成分 $a-2$ のトリグリセリド、中鎖脂肪酸トリグリセリド等を例示でき、成分 $b-2$ としては前記成分 $a-1$ の加水分解処理によって得られる脂肪酸がある。

【0018】エステル交換反応は一例として前記原料

をモル比率で成分 $a-1$ ：成分 $a-2=1:0.1\sim 5$ 、成分 $b-1$ ：成分 $b-2=1:2\sim 10$ となるように混合し、アルカリまたは金属アルコラートを触媒とする場合には実質的に無水状態として $80\sim 120^\circ\text{C}$ で $0.5\sim 3$ 時間エステル交換反応せしめる。またイオン交換樹脂を用いる場合も同様に無水状態とするが、室温 $\sim 40^\circ\text{C}$ 程度にてカラム方式で原料を循環接触させるのがよい。リパーゼを触媒として用いる場合には、原料中の水分量を1重量%以下にし、市販のリパーゼ粉末あるいはこれを公知の担体例えばセライト、ケイソウ土、活性炭、多孔質ガラス、イオン交換樹脂、キトサン、高分子ゲル、セルロース粉末等に固定化した固定化リパーゼを加え、 $20\sim 80^\circ\text{C}$ で $0.5\sim 20$ 時間エステル交換反応せしめる。

【0019】リパーゼは次に述べる微生物を起源とするものあるいは動物臓器由来のものを使用できる。すなわちアスペルギルス属（例えば *Aspergillus niger*）、ムコール属（例えば *Mucor miehei*）、キャンディグ属（例えば *Candida cylindracea*）、シュードモナス属（例えば *Pseudomonas fragi*）、アルカリゲネス属（例えば、特公昭58-36953号公報に記載の *Alcaligenes* sp.）、リゾプス属（例えば *Rhizopus delemar*）、ジオトリクム属（例えば *Geotrichum candidum*）等に属する微生物起源のリパーゼおよびブタ、ウシ等の脾臓リパーゼである。このうちアスペルギルス属、ムコール属、アルカリゲネス属およびリゾプス属の微生物を起源とするリパーゼ、ブタ脾臓リパーゼはグリセリドの1位および3位に特異的に作用するため、本発明のトリグリセリドを製造するに際しては好適である。

【0020】前述した各種エステル交換方法によって得られるエステル交換反応物は、選択する原料の種類によってはエステル交換反応物そのものを本発明で用いるトリグリセリドとすることができるが、前記化学合成法によって得られるエステル化生成物の場合と同様に、必要に応じてアルカリ脱酸処理、吸着・分画処理、溶剤分別処理あるいは無溶剤分別（ウィンタリング）処理等を適宜に組み合わせてエステル交換反応物に施し、不純物を除去したりグリセリド成分を分画あるいは濃縮して本発明で用いるトリグリセリドとすることもできる。なお該トリグリセリドは脱臭処理しておくことが望ましい。

【0021】本発明に係るトリグリセリドは天然物から油脂分を抽出する方法によっても得ることができる。すなわち前記エステル交換の原料（成分 $a-1$ ）として記載したもののうち、クジラ、アザラシ（harbour seal、harp seal 等）、オットセイ等の海産哺乳動物の体組織、該動物から分泌される乳汁、クロレラ、スピルリナ、ドナリエラ等の微細藻類の細胞またはこれらの培養細胞、ナンノクロロプシス（*Nannochloropsis*）属、トラストキトリウム（*Thraustochytrium*）属、クリプテコディニウム（*Cryptocodinium*）属およびイソクリシス

(*Isochrysis*) 属等に属する微細藻類例えばナンノクロロプシス オキユラータ (*Nannochloropsis oculata*)、トラストキトリウム アウレウム (*Thraustochytrium aureum*)、クリプテコディニウム コーニー (*Cryptocodinium cohnii*)、イソクリシスガルバナ (*Isochrysis galbana*) 等の細胞またはこれらの培養細胞を原材料とする。なお微生物を起源とする場合にはこれから得られるトリグリセリドが本発明のグリセリド構造を満足するものであればさしつかえない。

【0022】これらを圧搾処理もしくは n -ヘキサン、クロロホルム、ベンゼン、ジエチルエーテル、メタノール等の有機溶剤を用いて抽出処理または分別処理して油分を得、これに脱ガム、アルカリ脱酸、脱色、脱臭等の処理を施して遊離脂肪酸、リン脂質、糖脂質、不ケン化物、着色物質、有臭成分等の不純物を除き、グリセリド画分を得ることができる。このグリセリド画分は本発明で用いるトリグリセリドとして利用できるが、該グリセリド画分をさらに無溶剤低温分別、溶剤分別あるいはシリカゲル・カラム等により分画して、トリグリセリドの2位に結合する $n-3$ 系長鎖多価不飽和脂肪酸残基がより一層少ないトリグリセリドを製造することも可能である。

【0023】以上に述べたような化学合成法、エステル交換法、あるいは天然物からの抽出法等によって製造される本発明のトリグリセリドは、その構成脂肪酸としての $n-3$ 系長鎖多価不飽和脂肪酸の総量の40モル%未満がトリグリセリドの2位にエステル結合するものであるが、より好ましくは20モル%未満である。40モル%以上になると本発明の所望の効果は小さくなる。本発明のトリグリセリドはそのままで油脂として利用でき、また通常の食用油脂例えば成分b-1として記載したような動植物系油脂と混合して油脂としても用いることができる。このとき本発明のトリグリセリドの含有量は油脂全体の5~100重量%が望ましく、さらには10~100重量%がより一層好ましい。最も好ましくは20~100重量%である。5重量%未満では本発明の所望の効果が小さい。

【0024】本発明に係る油脂は例えば通常の食用動植物系油脂、ビタミンE、 β -カロチン等とともにソフトカプセルやマイクロカプセル等のカプセル状態にして摂取することができ、また通常の食用油脂と同様に食品素材として各種加工食品の原料、料理の材料に用い、摂食することができる。または本発明に係る油脂は高脂血症

の予防および治療のために利用されることが期待できる。

【0025】

【実施例】

実施例1

トリオレイン1kgと、魚油(タマ生化学(株)製、商品名:EPA-18)加水分解混合脂肪酸を低温分別した魚油加水分解脂肪酸濃縮物(総脂肪酸中の $C_{20:5}$:37.4モル%、 $C_{22:5}$:5.4モル%、 $C_{22:6}$:25.2モル%。 $n-3$ 系長鎖多価不飽和脂肪酸として72.5モル%。BHTを0.01重量%添加。)とをモル比で1:5にて混合し、水分含量を0.2重量%に調節した後、リボザイムIM20(商品名:ノボ ノルディスク社製、ムコール ミーハイ(*Mucor miehei*)由来のリパーゼ)を充填したガラス製カラム(10cmφ×60cm)に40℃にて通し選択的エステル交換反応を行わせた。

【0026】水蒸気蒸留および水洗処理にてエステル交換反応物から遊離脂肪酸を除去した後、 n -ヘキサンで浸潤させたシリカゲル(和光製薬(株)製、商品名:ワコーゲルC100)を充填したステンレス製カラムに供し、 n -ヘキサンで溶出させジグリセリドを除き、本発明のトリグリセリド720gを得た。本トリグリセリドを構成する全脂肪酸組成、グリセリドの1位および3位、2位の各脂肪酸組成をGLC分析によって求めた。この結果を表1に示す。本トリグリセリドを構成する $C_{20:5}$ の90モル%、 $C_{22:6}$ の95モル%以上、 $n-3$ 系長鎖多価不飽和脂肪酸の総量の93.5モル%がトリグリセリドの1位および3位に分布していた。すなわち本トリグリセリドの2位には $n-3$ 系長鎖多価不飽和脂肪酸の総量の6.5モル%が分布していた。本トリグリセリドを以下の動物実験の試験油とした。

【0027】本トリグリセリドの一部にナトリウムメトキシド0.1重量%を加え、減圧下100℃にてランダムエステル交換反応を行わせた後、セライトを用いて濾過し、本トリグリセリドのランダムエステル交換物を得た。この全脂肪酸組成、1位および3位、2位の各脂肪酸組成を前記同様に求めた(表1参照)。このトリグリセリドの2位には $n-3$ 系長鎖多価不飽和脂肪酸の総量の50.6モル%が分布していた。このランダムエステル交換物を動物実験の対照油とした。

【0028】

【表1】

表1 試験油および対照油の脂肪酸組成 (単位:モル%)

脂肪酸の 種 類※	試 験 油			対 照 油		
	全体	1,3位	2位	全体	1,3位	2位
18:1	43	26	74	46	42	43
18:4 (n-3)	3	5	0	3	2	3
20:4 (n-3)	3	4	0	2	2	2
20:5 (n-3)	25	34	4	24	21	23
22:5 (n-3)	3	5	0	3	2	3
22:6 (n-3)	17	24	1	17	17	14

※総炭素数:二重結合数で表示。(n-3)はn-3系脂肪酸を示す。

【0029】4週齢のSD系雄性ラット7匹を1試験区とし、試験油および対照油を各5重量%配合した飼料(表2参照)を用いて飼育実験を行った。この間、飼料成分の酸化劣化を防ぐために、飼料は毎日調製し給餌した。水と前記各飼料とを自由摂取させて3週間飼育したのち、各試験区ラットの血中および肝臓中の中性脂質、総コレステロールおよびリン脂質各含有量を測定した。この結果を表3に示す。なお各試験区とも飼料摂取量、

体重増加量および肝臓重量に有意差は認められなかった。この実験結果から、本発明に係るトリグリセリド(試験油)はラットに対して副作用がなく、試験油を添加した区では、血中トリグリセリド(中性脂質)および総コレステロールの値、肝臓中トリグリセリド値が顕著に低減することが明らかになった。

【0030】

【表2】

表2 飼料組成 (単位:重量%)

コーンスターチ	41.7
カゼイン	20.0
デキストリン	13.2
シュクロース	10.0
脂肪(試験油または対照油)	5.0
セルロース粉末	5.0
ミネラルミックス(※1)	3.5
ビタミンミックス(※2)	1.0
L-シスチン	0.3
重酒石酸コリン	0.2
TBHQ(※3)	0.1

※1 日本クレア(株)製、AIN-93G-MX

※2 日本クレア(株)製、AIN-93-VX

※3 トーブチルヒドロキノン

【0031】

【表3】

表3 血漿および肝臓中脂質濃度

	試験油添加区	対照油添加区
血漿脂質(mg/dl)		
トリグリセリド	130±4 ※	230±7
総コレステロール	123±4 ※	155±5
リン脂質	92±3 ※	125±4
肝臓脂質(mg/g-liver)		
トリグリセリド	10.5±0.3※	17.0±0.5
総コレステロール	2.5±0.1	3.5±0.1
リン脂質	29.3±0.9	31.6±1.1

※対照油添加区の値に対して危険率5%以下で有意差あり。

【0032】実施例2

試験油脂（本発明のトリグリセリドを含む油脂）および対照油脂を次のように調製した。すなわち試験油脂は h arp seal（アザラシ）油脂をドライアイス／アセトン冷媒で-80℃、1時間冷却し、析出した結晶部を濾紙で濾別して調製した。対照油脂は脂肪酸組成の異なる2種類の魚油（タラ肝油と雑魚油との混合油、マグロ眼窩

油）をドライアイス／アセトン冷媒で同様に冷却、分別した濃縮物をブレンドし、その総脂肪酸組成を試験油脂のそれとほぼ近似するものとした。表4にこれらの脂肪酸組成を示す。

【0033】

【表4】

表4 試験油脂および対照油脂の脂肪酸組成 (単位：モル%)

脂肪酸の種類※	試験油脂			対照油脂		
	全体	1,3位	2位	全体	1,3位	2位
16:0	2	1	3	9	11	7
16:1	16	7	32	9	10	6
18:0	0	0	0	2	3	0
18:1	14	12	18	16	20	8
18:2	3	0	6	1	2	1
18:3 (n-3)	2	0	4	1	1	1
18:4 (n-3)	6	6	5	4	4	5
20:1	4	6	1	3	4	2
20:4 (n-3)	2	2	1	3	3	3
20:5 (n-3)	14	21	3	19	15	25
22:1	1	1	0	2	1	1
22:5 (n-3)	7	10	1	2	1	3
22:6 (n-3)	19	28	3	19	14	27

※：表1の注釈と同じ。

【0034】4週齢のSD系雄性ラット7匹を1試験区とし、前記の試験油脂および対照油脂をそれぞれ20重量%含む油脂（試験油脂または対照油脂20重量部、パーム油50重量部、ハイオレイックサフラワー油5重量部およびハイリノールサフラワー油25重量部の混合油脂。脂肪酸組成は表5参照。）を各10重量%配合した飼料（飼料組成は脂肪5重量%を10重量%とし、コー

ンスターチ41.7重量%を36.7重量%とする以外は実施例1と同じ。）で、飼育実験を行った。この間、飼料成分の酸化劣化を防ぐために、飼料は毎日調製し給餌した。水と前記各飼料とを自由摂取させて3週間飼育したのち、各試験区ラットの血中および肝臓中の中性脂質、総コレステロールおよびリン脂質各含有量を測定した（表6参照）。なお各試験区とも飼料摂取量・体重増

加量および肝臓重量に有意な差異は認められなかった。減することが認められた。
 この実験結果から、本発明に係る油脂はラットに対して【0035】
 副作用を及ぼさず、血中および肝臓中のトリグリセリド【表5】
 (中性脂質)および総コレステロールの値を効果的に低

表5 飼料中油脂の脂肪酸組成 (単位:モル%)

脂肪酸の 種 類 ※	試 験 油 脂 20重量%配合	対 照 油 脂 20重量%配合
16:0	26.9	26.6
16:1	2.8	1.8
18:0	3.1	3.1
18:1	28.6	29.6
18:2 (n-6)	23.5	22.8
18:3 (n-3)	0.6	0.5
18:4 (n-3)	1.0	0.8
20:1	0.8	0.7
20:4 (n-3)	0.1	0.5
20:5 (n-3)	2.7	3.6
22:1	0.1	0.2
22:5 (n-3)	1.2	0.4
22:6 (n-3)	3.6	3.5
その他	5.0	5.9
脂肪酸の比率 ※※		
飽 和	34.1	34.5
モノ不飽和	33.3	33.3
n-6系	23.5	23.3
n-3系	9.1	9.0

※:表1の注釈と同じ。(n-6) はn-6系脂肪酸を示す。

※※:飽和脂肪酸、モノ不飽和脂肪酸、n-6系脂肪酸およびn-3系脂肪酸のうちの各脂肪酸の割合。

【0036】

【表6】

表6 血漿および肝臓中脂質濃度

	試験油脂添加区	対照油脂添加区
血漿脂質 (mg/dl)		
トリグリセリド	145±4 ※	223±7
総コレステロール	154±5 ※	172±5
リン脂質	94±3	121±4
肝臓脂質 (mg/g-liver)		
トリグリセリド	11.6±0.3 ※	16.0±0.5
総コレステロール	2.6±0.1	3.1±0.1
リン脂質	31.2±0.9	31.6±1.0

※:表3の注釈と同じ。

【0037】実施例3

実施例2で使った試験油脂および対照油脂の配合割合

を変えた油脂を飼料に添加して実施例2と同様にラット飼育実験を行った。すなわち4週齢のSD系雄性ラット

7匹を1試験区とし、実施例2に記載の試験油脂または対照油脂をそれぞれ10重量%含む油脂（試験油脂または対照油脂10重量部、パーム油50重量部、ハイオレリックサフラワー油10重量部およびハイリノールサフラワー油30重量部の混合油脂。脂肪酸組成は表7参照。）を各10重量%配合した飼料（飼料組成は脂肪分を除き実施例2と同じ。）で、飼育実験を行った。この間、飼料成分の酸化劣化を防ぐために、飼料は毎日調製した。水と前記各飼料とを自由摂取させて3週間飼育したのち、各試験区ラットの血中および肝臓中の中性脂

質、総コレステロールおよびリン脂質各含有量を測定した（表8参照）。なお各試験区とも飼料摂取量、体重増加量および肝臓重量に有意な差異は認められなかった。この実験結果および実施例2の結果から、本発明に係る油脂はラットに対して副作用を及ぼさず、対照油脂に比べて少量の試験油脂を混合した油脂の場合をも含めて、血中および肝臓中のトリグリセリド（中性脂質）値を顕著に低減する効果をもつことが認められた。

【0038】

【表7】

表7 飼料中油脂の脂肪酸組成 (単位：モル%)

脂肪酸の種類 ※	試験油脂 10重量%配合	対照油脂 10重量%配合
16:0	27.0	27.1
16:1	1.2	0.8
18:0	3.0	3.2
18:1	32.3	32.3
18:2 (n-6)	26.2	26.3
18:3 (n-3)	0.5	0.5
18:4 (n-3)	0.5	0.4
20:1	0.4	0.4
20:4 (n-3)	0.1	0.3
20:5 (n-3)	1.2	1.8
22:1	0.1	0.1
22:5 (n-3)	0.6	0.2
22:6 (n-3)	1.7	1.8
その他	5.2	4.8
脂肪酸の比率 ※※		
飽和	33.9	33.5
モノ不飽和	34.8	34.8
n-6系	26.8	26.6
n-3系	4.6	5.1

※および※※：表5の注釈と同じ。

【0039】

【表8】

表8 血漿および肝臓中脂質濃度

	試験油脂添加区	対照油脂添加区
血漿脂質 (mg/dl)		
トリグリセリド	140±4 ※	317±12
総コレステロール	163±5	187±5
リン脂質	103±3	125±4
肝臓脂質 (mg/g-liver)		
トリグリセリド	12.1±0.4※	17.2±0.5
総コレステロール	2.8±0.1	2.9±0.1
リン脂質	30.2±0.9	30.5±0.9

※：表3の注釈と同じ。

【0040】実施例4

微細藻類クリプトコディニウム コーニー (Cryptocodinium cohnii, ATCC 30336) を表9に示す培地30リットルに植つけ、30℃にて、ジャーファーマンターで100時間通気培養し、培養液から培養藻体を遠心分離して集め、さらにこれを凍結乾燥した(収量625g)。この乾燥藻体をクロロホルム：メタノール＝1：1(重量比)混合溶媒中でヒスコトロン(商品名。日音医理科器械製作所製)により細胞破碎して抽出し、油分520gを得た。n-ヘキサン中に分散させたシリ

カゲル(和光純薬(株)製、商品名：ワコーゲルC100)を充填したステンレス製カラムに前記油分を供し、ジエチルエーテル：n-ヘキサン＝10：90(容量比)にて溶出させ、本発明に係るトリグリセリド250gを得た。本トリグリセリド(これを試験油脂とした)の脂肪酸組成を実施例1と同様にして求めた(表10参照)。

【0041】

【表9】

表9 培地組成 (単位：培地1リットル当りの量)

NaCl	23.48 g
MgCl ₂ ・6H ₂ O	10.63 g
Na ₂ SO ₄	3.92 g
CaCl ₂	1.11 g
HCl	0.66 g
NaHCO ₃	0.19 g
KBr	0.10 g
H ₃ BO ₃	0.03 g
SrCl ₂ ・6H ₂ O	5.00 g
FeCl ₃ ・6H ₂ O	0.01 g
グリセロリン酸ナトリウム	0.15 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.05 g
K ₂ HPO ₄	0.01 g
トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン	3.00 g
グルコース	3.00 g
グルタミン酸ナトリウム	1.50 g
ビタミンミックス水溶液(※1)	1.0 ml
メタルミックス水溶液(※2)	3.0 ml

(pH：6.8)

※1：ビタミンミックス水溶液(単位：該水溶液1リットル中の重量)

ビオチン： 0.003 g

チアミン： 1.000 g

※2：メタルミックス水溶液(単位：該水溶液1リットル中の重量)

Na_2EDTA : 1.00 g
 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 0.05 g
 H_3BO_3 : 1.00 g
 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$: 0.15 g
 ZnCl_2 : 0.01 g
 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 0.005 g

【0042】

【表10】

表10 試験油脂の脂肪酸組成 (単位: モル%)

脂肪酸の種類 ※	全 体	1, 3 位	2 位
10:0	4.1	5.7	0.9
12:0	15.2	2.9	39.9
14:0	22.4	21.1	25.1
16:0	16.9	23.8	3.0
18:0	0.8	0.6	1.3
18:1	8.7	6.4	13.4
18:2	0.2	0.3	0.1
22:6 (n-3)	30.9	38.4	15.8
その他	0.8	0.8	0.5

※: 表1の注釈と同じ。

【0043】かくして得られた微細藻類由来のトリグリセリド(試験油脂)および実施例2に記載の対照油脂をそれぞれ10重量%含む油脂(試験油脂または対照油脂10重量部、パーム油50重量部、ハイオレイックサフラワー油10重量部およびハイリノールサフラワー油30重量部の混合油脂。脂肪酸組成は表11参照)を各10重量%配合した飼料(飼料組成は脂肪分を除き実施例3と同じ。)を調製し、実施例3と同様の飼育試験を行った。各試験区ラットの血中および肝臓中脂質含量の分析結果を表12に示す。なお各試験区とも飼料摂取量、

体重増加量および肝臓重量に有意差は認められなかった。この実験結果および実施例2の結果から、本発明に係る油脂はラットに対して副作用を及ぼさず、対照油脂に比べて少量の試験油脂を混合した油脂の場合をも含めて、血中および肝臓中のトリグリセリド(中性脂質)および総コレステロールの値を顕著に低減化する効果をもつことが認められた。

【0044】

【表11】

表11 飼料中油脂の脂肪酸組成 (単位: モル%)

脂肪酸の種類 ※	試験油脂 10重量%配合	対照油脂 10重量%配合
14:0	3.2	0.0
16:0	29.5	26.6
16:1	1.2	1.8
18:0	2.5	3.1
18:1	28.1	29.6
18:2 (n-6)	22.4	22.8
18:3 (n-3)	0.7	0.5
18:4 (n-3)	1.0	0.8
20:1	0.6	0.7
20:4 (n-3)	0.1	0.5
20:5 (n-3)	0.0	3.6
22:1	0.0	0.2
22:5 (n-3)	0.0	0.4
22:6 (n-3)	3.6	3.5
その他	7.1	5.9
脂肪酸の比率 ※※		
飽和	38.4	34.5
モノ不飽和	31.9	33.3
n-6系	23.9	23.3
n-3系	5.8	9.0

※および※※: 表5の注釈と同じ。

【0045】

【表12】

表12 血漿および肝臓中脂質濃度

	試験油脂添加区	対照油脂添加区
血漿脂質(mg/dl)		
トリグリセリド	134±4 ※	233±7
総コレステロール	135±5 ※	167±5
リン脂質	94±4 ※	125±5
肝臓脂質(mg/g-liver)		
トリグリセリド	9.2±0.3 ※	16.4±0.5
総コレステロール	2.5±0.1	3.3±0.1
リン脂質	29.7±0.8	30.8±0.8

※: 表3と同じ。

【0046】

【発明の効果】本発明によれば、動物に対して、副作用がなく、従来のn-3系長鎖多価不飽和脂肪酸供給源に比べて血中脂質濃度を低減化する効果が大きく、魚油等

の従来のn-3系長鎖多価不飽和脂肪酸供給源よりも少量の摂取で、血中および肝臓中のトリグリセリド値および/またはコレステロール値を減少させ、血中脂質改善を容易ならしめる作用のある油脂を提供できる。

【手続補正書】

【提出日】平成8年8月12日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0004

【補正方法】変更

【補正内容】

【0004】一方、エイコサペンタエン酸 (all cis - 5,8,11,14,17-eicosapentaenoic acid、以下EPAと略す。C_{20:5}、Cの後の数字は総炭素数：二重結合数を表わし以下同様とする。)やドコサヘキサエン酸 (all cis - 4,7,10,13,16,19 - docosahexaenoic acid、以下DHAと略す。C_{22:6})のようなn-3系長鎖多価不飽和脂肪酸およびこれらを含む食品素材が血清中トリグリセリド値やコレステロール値を低減させる作用があることが動物実験や臨床実験により明らかにされてきた(例えば、J.Dyerbergら、Prog.Lipid Res.、第21巻、第255~269頁、1982年)。血清中トリグリセリド値の低減化の作用機序はn-3系長鎖多価不飽和脂肪酸を含む油脂の摂取により肝臓内でのトリグリセリド合成能が抑制され、その結果として血中へのトリグリセリドの放出が抑制されるためと推測されている(原健次、油脂、第46巻、No. 4、第90頁、1993年)。また、血清中コレステロール値の低減はn-3系長鎖多価不飽和脂肪酸が肝臓におけるコレステロール合成能を抑制することによるものと推定されている。(Choi, Y.S.ら、Lipids、第24巻、第45頁、1989年)。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0016

【補正方法】変更

【補正内容】

【0016】前記エステル交換の原料は、成分a-1としてアマニ油、エゴマ油、シソ油等の植物油、イワシ油、タラ肝油、ニシン油、イカ油、マグロ眼窩油等の魚油、クジラ、アザラシ、オットセイ等の海産哺乳動物を起源として得られる圧搾もしくは抽出油、該動物の乳脂、クロレラ、スピルリナ、ドナリエラ等またナンノクロロバシス属(例えばNannochloropsis oculata、UTEX LB 2164等)、トラストキトリウム属(例えばThraustochytrium aureum、ATCC 28211、同34304等)、クリプトコディニウム属(例えばCryptocodinium cohnii、ATCC 30021、同30334、同30336、同50052等)、イソクリシス属(例えばIsochrysis galbana、CCAP927/1、UTEX LB 987等)等に属する微細藻類から抽出された油脂、モルティエラ(Mortierella)属等の微生物(M. isabellina、IFO 6336、同6739、同7873、同7884、ATCC 44853等)に由来する油脂、またn-3系長鎖多価不飽和脂肪酸またはこれを任意の割合で含む前記各種脂肪酸

(段落番号0012の項参照)との混合脂肪酸のトリグリセリドを使用できる。ここでATCC: American Type Culture Collection (米国)、CCAP: Culture Collection of Algae and Protozoa (英国)、UTEX: Culture Collection of Algae at the University of Texas (米国)、IFO: 大阪発酵研究所の各略称である。成分a-2としては段落番号0012の項に記載の各種脂肪酸またはその誘導体を用いることができる。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0029

【補正方法】変更

【補正内容】

【0029】4週齢のSD系雄性ラット7匹を1試験区とし、試験油および対照油を用い、各5重量%配合した飼料(表2参照)を用いて飼育実験を行った。この間、飼料成分の酸化劣化を防ぐために、飼料は毎日調製し給餌した。水と前記各飼料とを自由摂取させて3週間飼育したのち、各試験区ラットの血中および肝臓中の中性脂質、総コレステロールおよびリン脂質各含有量を測定した。この結果を表3に示す。なお各試験区とも飼料摂取量、体重増加量および肝臓重量に有意差は認められなかった。この実験結果から、本発明に係るトリグリセリド(試験油)はラットに対して副作用がなく、試験油を添加した区では、血中トリグリセリド(中性脂質)および総コレステロールの値、肝臓中トリグリセリド値が顕著に低減することが明らかになった。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0034

【補正方法】変更

【補正内容】

【0034】4週齢のSD系雄性ラット7匹を1試験区とし、前記の試験油および対照油脂を用い、それぞれ20重量%含む油脂(試験油脂または対照油脂20重量部、パーム油50重量部、ハイオレリックサフラワー油5重量部およびハイリノールサフラワー油25重量部の混合油脂。脂肪酸組成は表5参照。)を各10重量%配合した飼料(飼料組成は脂肪5重量%を10重量%とし、コーンスターチ41.7重量%を36.7重量%とする以外は実施例1と同じ。)で、飼育実験を行った。この間、飼料成分の酸化劣化を防ぐために、飼料は毎日調製し給餌した。水と前記各飼料とを自由摂取させて3週間飼育したのち、各試験区ラットの血中および肝臓中の中性脂質、総コレステロールおよびリン脂質各含有量を測定した(表6参照)。なお各試験区とも飼料摂取量、体重増加量および肝臓重量に有意な差異は認められなかった。この実験結果から、本発明に係る油脂はラットに対して副作用を及ぼさず、血中および肝臓中のトリ

グリセリド（中性脂質）および総コレステロールの値を効果的に低減することが認められた。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0043

【補正方法】変更

【補正内容】

【0043】かくして得られた微細藻類由来のトリグリセリド（試験油脂）および実施例2に記載の対照油脂を用い、それぞれ10重量%含む油脂（試験油脂または対照油脂10重量部、パーム油50重量部、ハイオレイックサフラワー油10重量部およびハイリノールサフラワ

ー油30重量部の混合油脂。脂肪酸組成は表11参照）を各10重量%配合した飼料（飼料組成は脂肪分を除き実施例3と同じ。）を調製し、実施例3と同様の飼育試験を行った。各試験区ラットの血中および肝臓中脂質含量の分析結果を表12に示す。なお各試験区とも飼料摂取量、体重増加量および肝臓重量に有意差は認められなかった。この実験結果および実施例2の結果から、本発明に係る油脂はラットに対して副作用を及ぼさず、対照油脂に比べて少量の試験油脂を混合した油脂の場合をも含めて、血中および肝臓中のトリグリセリド（中性脂質）および総コレステロールの値を顕著に低減化する効果をもつことが認められた。

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 31/23	A D N		A 6 1 K 35/12	
35/12			35/80	Z
35/80			A 2 3 D 9/00	5 1 6